异色瓢虫卵黄蛋白单克隆抗体的制备及鉴定

马　卓[1,2,#]，刘廷辉[1,#]，陈　洁[1,3]，梁　超[1]，曹美琳[1]，何运转[1,*]

（1. 河北农业大学植物保护学院，河北保定 071000；2. 中国农业大学农学与生物技术学院，北京 100094；
3. 邯郸市农业科学院，河北邯郸 056001）

摘要：【目的】为了能准确地追踪异色瓢虫 *Harmonia axyridis* (Pallas)卵黄原蛋白(vitellogenin, Vg)的合成、转运途径和吸收方式,以及卵黄蛋白(vitellin, Vn)在卵母细胞内的积累及分布情况,本研究对异色瓢虫的 Vn 进行了单克隆抗体(monoclonal antibody, McAb)的制备。【方法】以异色瓢虫 Vn 免疫 BLAB/C 小鼠,应用杂交瘤技术,经过 3 次亚克隆筛选,制备能稳定分泌抗 Vn 的单克隆抗体。【结果】实验获得 4 株能够稳定分泌抗异色瓢虫 Vn 的单克隆抗体,即 5E2, 5E11, 1E9 和 5H8。其中 1E9, 5E11 和 5E2 亚型均为 IgG1,5H8 亚型为 IgM。Western blot 免疫印迹分析显示,4 株单克隆抗体可以特异性地识别 Vn,而与雄虫血淋巴无反应。其中,5E2 和 1E9 可以与异色瓢虫抗原的 4 个亚基发生较强的免疫反应,结合腹水制备前上清效价检测结果最终选取 5E2 制备单克隆抗体。5E2 单克隆抗体的效价为 1∶81 000,SDS-PAGE 分析显示 5E2 重链和轻链的分子量分别为 50 和 27 kD。【结论】本实验成功制备出一株能够稳定分泌抗异色瓢虫 Vn 的单克隆抗体,为建立酶联免疫吸附试验(ELISA)方法测定其动态变化奠定了基础。

关键词：异色瓢虫；卵黄蛋白；单克隆抗体；亚型；亚基鉴定

中图分类号：Q966　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**0454-6296(2015)11-1186-08

Preparation and identification of monoclonal antibodies to the vitellin in *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae)

MA Zhuo[1,2,#], LIU Ting-Hui[1,#], CHEN Jie[1,3], LIANG Chao[1], CAO Mei-Lin[1], HE Yun-Zhun[1,*]
(1. College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071000, China; 2. College of Agriculture and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China; 3. Handan Academy of Agriculture Science, Handan, Hebei 056001, China)

Abstract:【Aim】In order to accurately track the synthesis, transport pathway and absorption of vitellogenin (Vg) in *Harmonia axyridis* (Pallas) as well as the accumulation and distribution of vitellin (Vn) in the oocytes, the monoclonal antibody (McAb) against Vn of *H. axyridis* was prepared.【Methods】The hybridoma cell lines secreting McAb against Vn of *H. axyridis* were produced by using hybridoma techniques, based on the cells from BALB/c mouse which were immunized with the Vn.【Results】We produced four monoclonal antibodies to *H. axyridis* soluble yolk proteins, *i. e.*, 5E2, 5E11, 1E9 and 5H8. Further identification indicated that 1E9, 5E11 and 5E2 were the isotype IgG1, and 5H8 was the isotype IgM. Western blot analysis showed that the four antibodies had high specificity and affinity to the Vn. However, they showed no immunological reaction with the male haemolymph. 5E2 and 1E9 had specific immunological reaction with the four subunits of the Vn. Finally, we selected 5E2 whose titer was the highest before ascites preparation to prepare the monoclonal antibodies. SDS-PAGE indicated that the molecular masses of 5E2 heavy chain and light chain were 50 and 27 kD, respectively, and its titer was 1∶81 000.【Conclusion】The successful preparation and identification of *H. axyridis* McAb may establish an essential tool for further building the ELISA method for assaying its dynamics.

Key words: *Harmonia axyridis*; vitellin (Vn); monoclonal antibody (McAb); isotype; subunit identification

---

基金项目：国家自然科学基金项目(31272095)；河北省中药材产业技术体系资助项目

作者简介：马卓，女，1989 年 1 月生，天津人，硕士研究生，研究方向为昆虫生理学，E-mail：xinning89@126.com；刘廷辉，男，1978 年 8 月生，河北高碑店人，研究方向为农业害虫生物防治，E-mail：liutinghui@126.com

共同第一作者 Authors with equal contribution

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail：heyz63@sina.com

收稿日期 Received：2015-02-17；接受日期 Accepted：2015-10-09

异色瓢虫 *Harmonia axyridis* (Pallas)隶属于鞘翅目瓢甲科，是蚜虫、鳞翅目昆虫卵和低龄幼虫、粉虱和螨等害虫的主要捕食性天敌(Koch, 2003；吴春娟等, 2011)，因其多发生在农田、果园和林业系统，并且具有捕食量大、寿命长和繁殖力强等特点，因而是一种具备开发潜力的天敌昆虫。由于目前大多数人工饲料对异色瓢虫生殖均有不利的影响，因此已成为制约其规模化生产的重要瓶颈之一。从生殖机理方面分析，卵黄原蛋白(vitellogenin, Vg)的合成、卵黄的沉积是卵形成的关键因素，从而直接影响昆虫的生殖力。因此研究异色瓢虫卵黄发生对于揭示昆虫的生殖生理具有重要的理论与实际意义。

20 世纪 80 年代已有报道对鞘翅目昆虫卵黄发生进行研究。张建中等(1985)利用放射免疫沉淀法测定了取食天然饲料和基础人工饲料的七星瓢虫 *Coccinella septempunctata* 雌虫卵黄发生的调节作用。关雪辰(1989)利用火箭免疫电泳法测定了不同剂量保幼激素类似物对七星瓢虫血淋巴中卵黄原蛋白含量的影响。但是由于昆虫个体较小，利用上述传统的方法来进行这类昆虫体内卵黄蛋白(vitellin, Vn)的微量变化的检测具有一定的难度。而酶联免疫吸附试验(ELISA)由于其特异性强、灵敏度高等特点而被用于检测昆虫体内卵黄蛋白的含量，但此方法的建立依赖于特异性的抗体。李恺等(2007)以龟纹瓢虫 *Propylea japonica* 卵黄蛋白为抗原制备多克隆抗体，建立间接竞争 ELISA 法测定龟纹瓢虫卵黄发生时卵黄蛋白的动态变化。陈洁(2011)以异色瓢虫卵黄蛋白为抗原制备多克隆抗体，建立直接 ELISA 法测定异色瓢虫体内脂肪体、血淋巴和卵巢内卵黄发生的动态变化。陶淑霞等(2004)以大草蛉 *Chrysopa septempunctata* 卵黄蛋白为抗原制备多克隆抗体，建立直接 ELISA 法测定了大草蛉成虫期脂肪体、血淋巴和卵巢中卵黄蛋白的动态变化，既降低了成本又提升了灵敏度。但多克隆抗体对抗原纯度的要求高，纯化抗原的过程相对繁琐，而单克隆抗体较多克隆抗体相比具有对抗原纯度的要求低、特异性更强以及灵敏度高等优点因而被广泛应用于研究昆虫的生殖调控。董胜张等(2007)以蝶蛹金小蜂 *Pteromalus puparum* 的卵黄蛋白为抗原制备单克隆抗体，并筛选出双抗夹心 ELISA 法为检测单头雌蜂体内 Vg/Vn 的最适方法，灵敏度高。李晓明等(2008)以长角血蜱 *Haemaphysalis longicornis* 的卵黄蛋白为抗原制备单克隆抗体，为阐明长角血蜱卵黄发生过程提供重要工具。郭建洋(2010)以烟粉虱 *Bemisia tabaci* 卵黄蛋白为抗原制备单克隆抗体和多克隆抗体，采用双抗夹心 ELISA 法对烟粉虱体内血淋巴和卵巢内卵黄原蛋白及卵黄磷蛋白含量测定。目前在鞘翅目昆虫中有应用单克隆抗体作为评价捕食性天敌食性的研究工具(Bacher *et al*., 1999)，而在监测卵黄发生动态的应用还比较少，本文以异色瓢虫的卵黄蛋白为抗原制备单克隆抗体，并对纯化的抗体进行鉴定，以期为异色瓢虫体内卵黄发生的动态检测、激素对卵黄发生调控规律研究等提供良好的基础。

1　材料与方法

1.1　供试昆虫

异色瓢虫 *H. axyridis* 采自河北农业大学标本园，在人工气候箱内用菜缢管蚜 *Lipaphis erysimi* 进行连代饲养，温度 25 ± 1℃，相对湿度 66% ± 5%，光周期 16L∶8D 。

1.2　异色瓢虫卵黄蛋白抗原的制备

取不同个体新鲜的异色瓢虫卵，每 1 g 卵加 20 mL 0.4 moL/L 的 NaCl 溶液，匀浆，匀浆液在 4℃ 以 10 000 r/min 离心 20 min，取上清，以 1∶8 ~ 1∶10 的比例加入冷重蒸水，置于 4℃ 静置过夜使卵黄蛋白逐渐沉淀。将沉淀溶液再次于 4℃ 以 5 000 r/min 离心 20 min，弃上清液收集粗沉淀物，向粗沉淀物中再次加入少量 0.4 mol/L 的 NaCl 溶液，低速离心后弃去不溶物取上清，再次以 1∶8 ~ 1∶10 的比例加入冷重蒸水，4℃ 静置过夜使卵黄蛋白再沉淀。重复以上过程 4 次，将最后收集的卵黄蛋白利用 native-PAGE 电泳分析纯度，-70℃保存备用。

1.3　卵黄蛋白单克隆抗体的制备

所用免疫动物为 5 头(3 头雄性，2 头雌性)6 - 8 周龄的 BLAB/C 小鼠(购自扬州大学比较医学中心)。初次免疫时将抗原(雄性 80 μg/头，雌性 250 μL/头)与等体积弗氏完全佐剂充分乳化，背部皮下多点免疫。此后每隔两周分别进行第 2 次、第 3 次和第 4 次免疫，免疫时将抗原(雄性 40 μg/头，雌性 250 μL/头)与等体积弗氏完全佐剂充分乳化。第 4 次免疫两周后进行终加强免疫，以不含佐剂抗原(雄性 80 μg/头，雌性 100 μL/头)在脾内加强免疫。免疫 3 d 后，取其脾细胞与呈对数增长期的骨髓瘤细胞 SP2/0(江苏康为世纪生物科技有限公司)以 1∶6(v/v)的比例在 50% 聚乙二醇(PEG)3000 作用下进行细胞融合。融合后的细胞首先在 HAT 培养基进行选择培养，于融合后 7 - 14 d 筛选融合细胞，

采用间接 ELISA 方法对融合细胞上清筛选,经过两次筛选最终确认阳性细胞孔进行单克隆化。采用有限稀释方法对所有筛选确认的阳性细胞株进行亚克隆,待细胞集落生长至显微镜视野 1/3 时吸取上清以间接 ELISA 法进行筛选;待亚克隆阳性率达到 100% 时,正式建株,每株细胞冻存 5 支以上。

1.4 亚型检测

抗体亚型的检测试剂盒由 Southern Biotech 公司生产,应用酶联免疫吸附法(ELISA)和荧光免疫吸附法(FLISA),具体实验方法参照厂家说明书。(1)1 mg 纯化的抗体溶解在 1 mL pH 8.2 的硼酸盐缓冲液中。(2)1 mg FITC, TRITC, TXRD, CY5, AF488, AF647 和 AF555 的混合物溶解在 1 mL PBS/NaN_3 中。(3)1 mL 的 AP 储备液溶于 pH 8.0 50 mmol/L Tris/1 mmol/L $MgCl_2$/50% 甘油中,包含 0.1% NaN_3 作为防腐剂。(4)1 mL 的 HRP 储备液溶于 pH 7.4 50% 甘油/50% PBS 中,不添加防腐剂。(5)1 mg BIOT 溶于 2 mL PBS/NaN_3 中。(6)0.5 mg PE 溶于 1 mL PBS/NaN_3 中。(7)0.25 mg SPRD 溶于 0.5 mL PBS/NaN_3 中。(8)0.25 mg PE/CY7 和 APC/CY7 溶于 1 mL PBS/NaN_3 中。

1.5 阳性杂交瘤细胞株腹水制备及腹水效价检测

取 2 头 BALB/C 小鼠,每头注射 0.5 mL 石蜡油,7 d 后取杂交瘤细胞(效价较高同时细胞状态好)重悬于无血清培养基中,按 1×10^6 个细胞/0.5 ml/只量注射石蜡小鼠,注射细胞约 7~14 d 后收集腹水,以间接 ELISA 法检测腹水效价。(1)包被:2 μg/mL(下同)抗原浓度,100 μL/孔,4℃过夜,洗液洗涤 3 次。(2)封闭:加 150 μL/孔封闭液,37℃ 2 h后,洗涤 3 次,拍干。置 4℃冰箱保存备用。(3)加待测样品:对于血清/抗体/腹水效价检测,第一个孔 1∶1 000 稀释,往下以 1∶3 的梯度倍比稀释,37℃孵育 30 min,洗板 4 次,拍干。对于细胞上清检测,吸取细胞上清 100 μL,加入对应的酶标板中,37℃孵育 30 min,洗板 4 次,拍干。(4)加二抗:取辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG(IgG 特异二抗)按 1∶5 000(v/v)稀释后,100 μL /孔,37℃孵育 20~30 min,洗涤 4 次,拍干。(5)显色:稀释 20×TMB 至 1×TMB,按 100 μL /孔加入,37℃ 显色 15~30 min。(6)终止:加入终止液(2 mol/L H_2SO4)50 μL/孔。(7)读数:以 450 nm 单波长测定各孔 OD 值,以与阴性对照孔 OD 值的比值(P/N)大于 2.1 为限,作为判断为阳性或确定效价的临界点。筛选阳性细胞时,P/N > 2.1 的判别为阳性细胞;1 < P/N < 2.1 的细胞孔加大包被浓度后再次检测,P/N > 2.1 的仍判为阳性。效价以 P/N > 2.1 的血清最大稀释倍数表示。

1.6 杂交瘤细胞的 Western blot 分析

(1)SDS-PAGE 电泳:将抗原和对照(雄虫血淋巴)按一定比例加入 5×上样缓冲液,沸水中煮 5 min,上样。浓缩胶 4%,分离胶 8%,浓缩胶电泳时电压 60 V,分离胶电泳时电压 120 V。(2)剪取与分离胶大小相同的 PVDF 膜和 4 张滤纸,将膜放入甲醇中 1-2 min,最后把 4 张滤纸和膜一起放入转膜缓冲液(甘氨酸 2.93 g,Tris 碱 5.81 g,SDS 0.375 g,加入 200 mL 甲醇,重蒸水定容至 1 000 mL)中备用。(3)转膜:将胶条上的浓缩胶切去,并在分离胶的一角上做好标记,在转膜装置上从负极到正极按照海绵、滤纸、胶、膜、滤纸和海绵的顺序排放,赶尽膜和胶中间气泡, 100 mA 稳流电转移 1 h。(4)封闭:用 5% 的脱脂奶粉[TBST(TBS, 0.05% Tween-20)溶解]进行封闭,室温下置摇床上摇动 5 min, 4℃过夜。(5)孵育一抗: 用 TBST 配制 5% 脱脂奶粉,按 1∶400 的比例稀释制备好的一抗,将转膜后的 PVDF 膜移入一抗溶液中室温孵育 2~3 h。(6)洗涤: 用 TBST 将膜室温洗涤 4 次,每次 5 min,洗掉表层脱脂奶粉。(7)孵育二抗: 用配好的 5% 脱脂奶粉(TBST 溶解)按 1∶2 000 的比例稀释二抗羊抗小鼠 IgG,将膜转入二抗溶液中室温孵育 1 h。(8)洗涤:用 TBST 将膜室温洗涤 4 次,每次 5 min。(9)显色:采用 ECL 显色试剂盒(试剂盒购自康为世纪),将两种显色底物 1∶1 等体积混合,混匀后均匀覆盖在 PVDF 膜表面,置于摇床上室温下摇动 3~5 min,用保鲜膜将 PVDF 膜包起来,在暗室中用 X 光片于暗夹中曝光,显影和定影。

1.7 腹水纯化及抗体效价检测

(1)平衡:用 Binding Buffer(12.114 g Tris 加适量双蒸水溶解,调 pH 值至 7.5,加 8.775 g NaCl,定容至 1 L)平衡 protein G 亲和柱至基线平稳;(2)上样:将腹水样品上柱,收集流穿液;将流穿液再次上柱,继续平衡至基线平稳。(3)洗脱:加入 Eluting Buffer(7.5g 甘氨酸加入适量双蒸水溶解,调 pH 值至 3.0,加 8.775 g NaCl,定容至 1 L)洗脱,收集洗脱峰,SDS-PAGE 检测纯度。(4)用 0.01 mol/L pH 7.2 PBS 透析收集的洗脱峰,使纯化后的抗体保存在 0.01 mol/L pH 7.2 PBS 环境中。(5)用蛋白定量检测仪测定纯化后单抗的浓度。(6)SDS-PAGE

检测纯化后抗体纯度，每泳道上样 8 μg 抗原抗体。(7)采用间接 ELISA 法检测纯化抗体效价。

2　结果

2.1　异色瓢虫卵黄蛋白的 Native-PAGE 电泳

异色瓢虫的卵黄蛋白经纯化后 8% Native-PAGE 电泳结果显示出一条目标条带，根据卵黄蛋白的分子量 625.9 ± 12.1 kD 可以判断该目的条带即为 Vn(图 1)。

SDS-PAGE 电泳结果显示，纯化后的卵黄蛋白有 4 个亚基，分子量分别为 154.6，133.2，44.1 和 40.0 kD(图 2)。

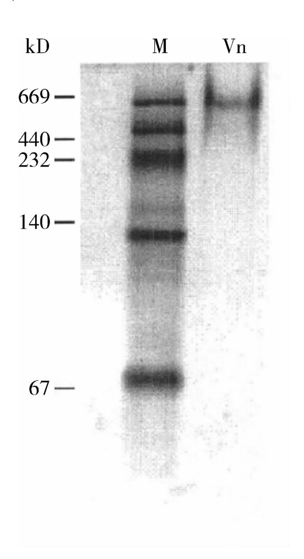


图 1　异色瓢虫卵黄蛋白 8% PAGE 电泳图

Fig. 1　The 8% Native-PAGE of vitellin (Vn) of *Harmonia axyridis*

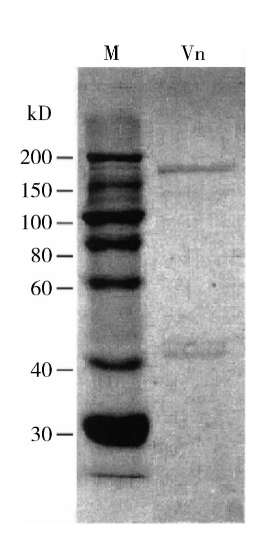


图 2　异色瓢虫卵黄蛋白 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 2　SDS-PAGE of vitellin (Vn) of *Harmonia axyridis*

2.2　细胞融合及杂交瘤细胞的筛选

本研究对 5 块 96 孔板进行融合，共有 8 个阳性细胞孔，为保证阳性率的稳定，再扩至 24 孔以再次检测确定(表 1)，结果显示 4 株细胞孔(2H7，2A9，1A10 和 3A6)转阴，剩下 4 株应用有限稀释法进行亚克隆，经过 3 次亚克隆阳性率达 100%，正式建株 4 个分泌抗卵黄蛋白单克隆抗体的细胞株，分别为 5E2，5E11，1E9 和 5H8。

表 1　8 株融合细胞间接 ELISA 测定

Table 1　Titers of eight fused strains using indirect ELISA method

克隆号 Clone ID	OD 值 OD value
2H7	0.236
2A9	0.958
5E2	2.881
5E11	2.930
1E9	4.000
5H8	2.954
1A10	0.952
3A6	0.685

2.3　抗卵黄蛋白单克隆抗体阳性细胞株的亚型鉴定

经检测(表 2)，1E9，5E11 和 5E2 这 3 株细胞亚型均为 IgG1，5H8 为 IgM。

表 2　4 株阳性细胞亚型鉴定

Table 2　Isotype identification of four positive strains

亚型 Isotype	1E9	5E11	5E2	5H8
IgG1	4.00	4.00	3.863	0.11
IgG2a	0.108	0.084	0.148	0.086
IgG2b	0.172	0.154	0.134	0.117
IgG3	0.108	0.124	0.215	0.101
IgM	0.09	0.101	0.103	1.807
IgA	1.514	1.489	0.128	0.109

表中数据为 P/N 的比值。The data are P/N values.

2.4　腹水制备及效价测定

2.4.1　腹水制备前上清效价测定：腹水制备前以间接 ELISA 法对上清效价进行检测，结果见表 3，当 4 株细胞上清稀释倍数达 1∶2 430 时，OD 值由高到低依次为 1E9，5E2，5E11 和 5H8。

2.4.2　四株细胞卵黄蛋白单克隆抗体的 Western blot 分析：异色瓢虫的卵黄蛋白由 4 个亚基组成，亚基的相对分子质量分别为 154.6，133.2，44.1 和 40.0 kD。Western blot 分析结果(图 3)显示，所制备的 4 株细胞具有明显的特异性，仅与抗原呈现免疫反应而与对照(雄虫血淋巴)无反应。图 3(A)为

表 3　4 株细胞腹水制备前上清效价测定

Table 3　Determination of titers of supernatants to four strains before ascites preparation

稀释倍数 Dilution ratio	1E9	5E2	5H8	5E11
原液 Original solution	1.372	3.151	3.063	2.456
1∶10	1.334	2.51	3.133	2.578
1∶30	1.442	2.884	3.171	2.536
1∶90	1.424	2.44	3.045	2.334
1∶270	1.503	3.114	3.325	2.327
1∶810	1.710	3.270	2.235	2.037
1∶2 430	3.265	3.031	1.058	1.532
PBS	0.042	0.045	0.048	0.045

在较短曝光时间下,4 株细胞在分子量为 154.6 和 133.2 kD 处均出现 2 条目的条带,而 44.1 和 40.0 kD 处不显现目的条带;图 3(B)为在较长曝光时间下,4 株细胞在 44.1 和 40.0 kD 处均出现 2 条目的条带,而 154.6 和 133.2 kD 处目的条带逐渐变得不清晰。4 株细胞 Western blot 结果比较,5E2 与 1E9 显现的 4 条目的条带更加明显,说明 5E2 与 1E9 与异色瓢虫 Vn 的 4 个亚基发生较强免疫反应。5E2 和 1E9 相比较,5E2 出现的 4 条目的条带更加清晰,结合腹水制备前上清效价检测结果最终选取 5E2 作为腹水正常细胞株。

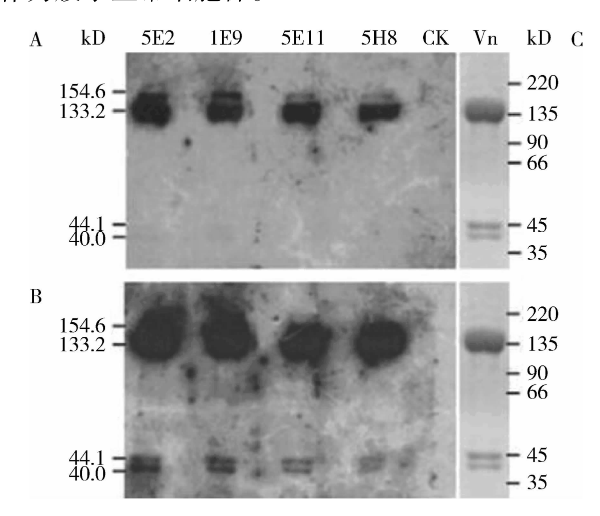


图 3　异色瓢虫卵黄蛋白单克隆抗体的 Western blot 分析

Fig. 3　Western blot analysis of the monoclonal antibody against the vitellin of *Harmonia axyridis*

A: 短时间曝光 Short exposure time; B: 长时间曝光 Long exposure time; C: 卵黄蛋白 SDS-PAGE 电泳 SDS-PAGE of Vn. CK: 雄虫血淋巴 Male adult hemolymph; 5H8, 5H11, 1E9, 5E2: 分别示卵黄蛋白单克隆抗体 Various monoclonal antibody against the Vn.

2.4.3　纯化后腹水效价测定:以 5E2 作为腹水正常细胞株,制备腹水小鼠 2 头,10 d 后共收集 8 mL 腹水并进行纯化。纯化后的腹水经间接 ELISA 法检测显示,腹水效价为在 1∶720 000 以上(表 4)。

表 4　5E2 腹水纯化后效价测定

Table 4　Determination of the titer of purified 5E2 ascites

稀释倍数 Dilution ratio	5E2 效价 5E2 titer
1∶1 000	2.639
1∶3 000	2.271
1∶9 000	2.187
1∶27 000	1.778
1∶81 000	1.175
1∶240 000	0.672
1∶720 000	0.311
PBS	0.063

2.5　单克隆抗体的效价测定

经间接 ELISA 法检测显示,5E2 抗体效价为 1∶81 000(表 5)。浓度为 1 mg/mL。

表 5　5E2 抗体效价测定

Table 5　Determination of the titer of 5E2 antibody

稀释倍数 Dilution ratio	5E2 效价 5E2 titer
1∶1 000	2.485
1∶3 000	1.909
1∶9 000	1.080
1∶27 000	0.513
1∶81 000	0.202
1∶240 000	0.054
1∶720 000	0.042
PBS	0.040

2.6　单克隆抗体的 SDS-PAGE 分析

经 SDS-PAGE 分析(图 4),5E2 抗体主要有 2 条条带,分别为重链和轻链,分子量分别为 50 和 27 kD。抗体纯度达 95% 以上。

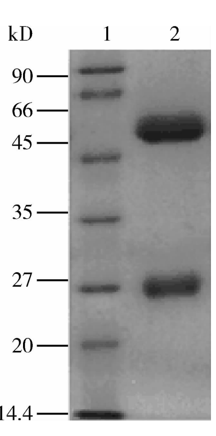


图 4　异色瓢虫卵黄蛋白单克隆抗体的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4　SDS-PAGE analysis of the monoclonal antibody against the vitellin of *Harmonia axyridis*

1: 标准蛋白 Standard protein marker; 2: 单克隆抗体(5E2) Monoclonal antibody (5E2).

2.7　单克隆抗体的 Western blot 分析

经 Western blot 分析(图 5),单克隆抗体 5E2 可以特异性地与抗原发生免疫反应,而与对照无反应。在短时间曝光条件下(图 5：B),5E2 在分子量为 154.6 和 133.2 kD 处出现 2 条目的条带,而 44.1 和 40.0 kD 处不显现目的条带,但在较长曝光时间下(图 5：A),5E2 在 44.1 和 40.0 kD 处出现目的条带,而 154.6 和 133.2 kD 处目的条带逐渐变得不清晰。

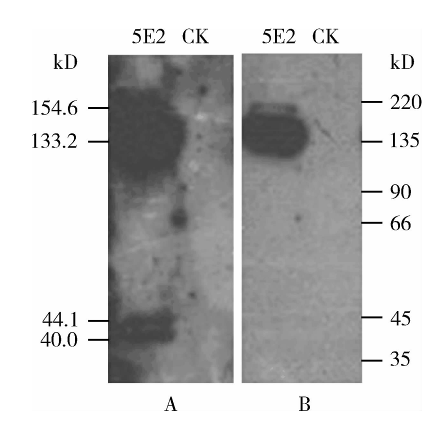


图 5　异色瓢虫卵黄蛋白单克隆抗体 5E2 的 Western blot 分析

Fig. 5　Western blot analysis of the monoelonal antibody 5E2 against the vitellin of *Harmonia axyridis*

A：长时间曝光 Long exposure time；B：短时间曝光 Short exposure time. 5E2：卵黄蛋白单克隆抗体 Monoclonal antibody against the Vn；CK：雄虫血淋巴 Male adult hemolymph.

3　讨论

昆虫卵黄原蛋白是一种大分子量的寡聚糖脂复合蛋白,约含有 1% ~4% 的糖类,6% ~16% 的脂类及约 84% 的氨基酸(董胜张等, 2008)。在已测序的 25 种昆虫的 Vg 中,均由 6 ~7 kb 的 mRNA 进行编码,首先形成分子量约为 200 kD 的前体蛋白,前体蛋白被蛋白酶水解成 40 ~60 kD 和 140 ~190 kD 大小两种亚基,亚基经聚合、修饰后形成 Vg。根据 Vg 的亚基组成和分子量大小可以将昆虫分为以下 3 类:第 1 类,大多数昆虫的 Vg 由大亚基(>150 kD)和小亚基(<65 kD)组成,例如绝大多数完全变态的昆虫。第 2 类,只含有一个大亚基,Vg 基因中编码小亚基单位的部分缺失或不表达,只有编码大亚基的部分才有转录活性,例如一些高等膜翅目昆虫如日本瘤姬蜂 *Pimpla nipponica*(Nose, 1997)。第 3 类,由几个分子量约为 80 ~110 kD 的多肽组成。研究表明七星瓢虫的 Vn 由 133, 130, 46 和 43 kD 4 个亚基组成(翟启慧, 1985),龟纹瓢虫的 Vn 由 144 和 51 kD 两个亚基组成(李凯, 2007)。本研究发现异色瓢虫的 Vn 由 4 个亚基组成,相对分子质量分别为 154.6, 133.2, 44.1 和 40.0 kD。可以看出异色瓢虫 Vn 的亚基组成与七星瓢虫相似。

昆虫卵黄原蛋白的特性、卵黄发生动态及模式以及其内分泌调控模式一直是昆虫生理学研究的热点,研究方法从最初的放射免疫法和火箭免疫电泳法到依赖特异性抗体的 ELISA 法,检测灵敏度逐渐增强。其中以多克隆抗体免疫法测定昆虫卵黄发生规律较为普遍。Venugopal 和 Kumar(1999)应用凝胶过滤和离子交换层析法从棉红蝽 *Dysdercus koenigii* 卵中提取卵黄蛋白制备多克隆抗体,免疫印迹法分析在棉红蝽初羽化的雌虫中,第 1 天在脂肪体中检测到 Vg,第 3 天在血淋巴和卵巢中,Vg 含量的最大值分别出现在第 2 天脂肪体中,第 4 天血淋巴中和第 7 天卵巢中。陈洁(2011)以异色瓢虫卵黄蛋白为抗原制备多克隆抗体,建立直接 ELISA 法测定不同饲料对异色瓢虫卵黄发生的影响。吴举彬(2008)以间接 ELISA 法检测外源激素对韭菜迟眼蕈蚊 *Bradysia odoriphaga* 卵黄蛋白含量的影响,通过观察对卵黄蛋白生物合成和摄取的影响,来探讨该害虫卵黄发生激素的调控机理。

自 20 世纪 70 年代 Kohler 和 Milstein(1975)首次应用杂交瘤技术生产单克隆抗体以来,该项技术由于可作为亲和层析配体、免疫抑制剂、还可以作为探针以及生物治疗工具等多种特点而得以迅速发展并被广泛应用于生物科学的各个领域。单克隆抗体与多克隆抗体相比有很多优点:首先,单克隆抗体具有高度的特异性,能够稳定并准确地识别目的抗原,而与其他抗原不发生交叉反应。其次,单克隆抗体对抗原纯度的要求不高,低纯度的抗原也可制备出高特异性的抗体。国内外已制备出多种昆虫的单克隆抗体,例如:Shapiro 等(2000)制备了捕食性椿象 *Podisus maculiventris* 卵黄蛋白单克隆抗体并建立 ELISA 检测方法,定量分析不同饲料对椿象雌虫繁殖力的影响。Masetti 等(1998)制备了竹节虫 *Carausius morosus* 卵黄蛋白多肽的单克隆抗体和多克隆抗体,以此为探针鉴定胚胎中的多肽并证实这些多肽与卵母细胞中的卵黄发生有何种联系。Stuart 和 Greenatone(1996)以侧沟茧蜂 *Microplitis croceipes* 单克隆抗体为基础建立免疫诊断分析方法。董胜张等(2007)以蝶蛹金小蜂 *P. puparum* 的卵黄蛋白为抗原制备单克隆抗体,筛选出双抗夹心 ELISA 法为检测单头雌蜂体内 Vg/Vn 的最适方法,灵

敏度高。李晓明等(2008)以长角血蜱 *H. longicornis* 的卵黄蛋白为抗原制备单克隆抗体,为阐明长角血蜱卵黄发生过程提供重要工具。本研究利用蒸馏水沉淀法提取异色瓢虫卵黄蛋白制备抗原,PAGE 电泳分析结果显示与陈洁(2011)课题组利用同种方法提取卵黄蛋白测定的分子量基本一致,由此可知此抗原即为卵黄蛋白。研究中并未对抗原蛋白进行细致的纯化,而是直接利用杂蛋白进行免疫,然后应用酶联免疫(ELISA)进行筛选,筛选出的阳性克隆细胞株再进行腹水上清效价检测和 Western blot 分析,结合两者分析结果最终获得一株特异性单克隆抗体。此方法在蝶蛹金小蜂卵黄蛋白单克隆抗体制备中已有所应用,这种方法与常规方法相比,不必经过复杂而耗时的抗原蛋白的纯化,对于制备那些难以获得大量可供纯化蛋白混合的小型昆虫的某种特定蛋白抗体来说非常有效(董胜张等, 2007)。

目前在鞘翅目昆虫中多应用多克隆抗体建立 ELISA 研究方法测定卵黄发生动态,而单克隆抗体应用较少,Webb(1995)以黄粉虫 *Tenebrio molitor* 卵黄蛋白制备单克隆抗体建立 ELISA 检测法,精准定量分析黄粉虫被寄生后卵巢内 Vn 含量的变化量。本研究成功制备出一株能够稳定分泌抗异色瓢虫卵黄蛋白的单克隆抗体 5E2,可以高度特异性地识别目标抗原。异色瓢虫 Vn 单克隆抗体含有一条重链和一条轻链,分子量分别为 50 和 27 kD,抗体纯度达95%以上。今后可应用此单克隆抗体建立 ELISA 检测方法,筛选出灵敏度高、稳定性好的检测方法,为异色瓢虫体内卵黄发生的动态检测、激素对昆虫生殖调控的规律研究等提供良好的技术手段。

参考文献(References)

Bacher S, Schenk D, Imboden H, 1999. A monoclonal antibody to the shield beetle *Cassida rubiginosa* (Coleoptera, Chrysomelidae): a tool for predator gut analysis. *Biological Control*, 16: 299-309.

Chen J, 2011. Oogeesis and Effect of Diets on Vitellogenesis of *Harmonia axyridis* Pallas. PhD Dissertation, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei. [陈洁, 2011. 异色瓢虫卵子发生及饲料对其卵黄发生的影响. 河北保定: 河北农业大学博士学位论文]

Dong SZ, Gao XY, Cheng ZX, Hu C, Ye GY, 2007. Development of monoclonal antibodies to the vitellin in an endoparasitoid, *Pteromalus puparum* (Hymenoptera: Pteromalidae) and its application methods. *Acta Entomologica Sinica*, 50(9): 871-877. [董胜张, 高秀云, 程正贤, 胡萃, 叶恭银, 2007. 蝶蛹金小蜂卵黄蛋白单克隆抗体的制备及其应用方法的建立. 昆虫学报, 50(9): 871-877]

Dong SZ, Ye GY, Liu CL, 2008. Research progress in molecular evolution of yolk proteins in insects. *Acta Entomologica Sinica*, 51(11): 1196-1209. [董胜张, 叶恭银, 刘朝良, 2008. 昆虫卵黄蛋白分子进化的研究进展. 昆虫学报, 51(11): 1196-1209]

Guan XC, 1989. Effects of exogenic juvenile hormone analogue on haemolymph vitellogenin content in *Coccinella septempunctata* L. *Acta Entomologica Sinica*, 32(1): 6-11. [关雪辰, 1989. 外源保幼激素类似物对七星瓢虫血淋巴中卵黄原蛋白含量的影响. 昆虫学报, 32(1): 6-11]

Guo JY, 2010. Vitellogenesis and Sequences Analysis of Vitellogenin and Vitellogenin Receptor Gene in Whiteflies *Bemisia tabaci* Gennadius (Hemiptera: Aleyrodidae). PhD Dissertation, Zhejiang University, Hangzhou. [郭建洋, 2010. 烟粉虱卵黄发生、卵黄蛋白及其受体基因序列的分析. 杭州: 浙江大学博士学位论文]

Koch RL, Hutchison WD, Venette RC, Heimpel GE, 2003. Susceptibility of immature monarch butterfly, *Danaus plexippus* (Lepidoptera: Nymphalidae: Danainae), to predation by *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coecinellidae). *Biological Control*, 28(2): 265-270.

Kohler G, Milstein C, 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256: 495-497.

Li K, Zhang TS, Zhang LL, Wang B, Wang Q, 2007. Molecular characterization and dynamic analysis on vitellin of *Propylea japonica* (Thunberg) (Coleoptera: Coccinellidae). *Acta Entomologica Sinica*, 50(10): 975-980. [李恺, 张天澍, 张丽莉, 王斌, 王群, 2007. 龟纹瓢虫卵黄蛋白的分子特性及发生动态. 昆虫学报, 50(10): 975-980]

Li XM, Zhang ZP, Yang XL, Wang D, Liu JZ, 2008. Preparation and identification of monoclonal antibodies to the vitellin from the hard tick *Haemaphysalis longicornis* Neumann (Arachnida: Ixodidae). *Acta Entomologica Sinica*, 51(10): 1028-1032. [李晓明, 张志平, 杨小龙, 王多, 刘敬泽, 2008. 长角血蜱卵黄蛋白单克隆抗体的制备及鉴定. 昆虫学报, 51(10): 1028-1032]

Masetti M, Cecchettini A, Giorgi F, 1998. Mono and polyclonal antibodies as probes to study vitellin processing in embryos of the stick insect *Carausius morosus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 120: 625-631.

Nose Y, Lee JM, Veno T, Hatakeyama M, Oishi K, 1997. Cloning of cDNA for vitellogenin of the parasitoid wasp, *Pimpla nipponica*: vitellogenin primary structure and evolution considerations. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27(9): 1047-1056.

Shapiro JP, Wasserman HA, Greany PD, Nation JL, 2000. Vitellin and vitellogenin in the soldier bug, *Podisus maculiventris*: identification with monoclonal antibodies and reproductive response to diet. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 44: 130-135.

Stuart MK, Greenatone MH, 1996. Serological diagnosis of parasitism: a monoclonal antibody-based immunodot assay for *Microplitis croceipes* (Hymenoptera: Braconidae). In: Symondson WOC, Liddell JE eds. Ecology of Agricultural Pests-Biochemical Approaches. Springer Netherlands, Berlin. 301-321.

Tao SX, Zhang F, Li CD, 2004. Dynamic analysis on the vitellogenesis of *Chrysopa septempunctata*. *Journal of Jilin Agricultural University*,

26(3)：260－262，271.［陶淑霞，张帆，李成德，2004. 大草蛉卵黄发生的动态分析. 吉林农业大学学报，26(3)：260－262，271］

Venugopal KJ, Kumar D, 1999. Vitellins and vitellogenins of *Dysdercus koenigii* (Heteroptera: Pyrrhocoridae) - identification, purification and temporal pattern. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 124: 215－223.

Webb TJ, Hurd H, 1995. The use of a monoclonal antibody to detect parasite induced reduction in vitellin content in the ovaries of *Tenebrio molitor*. *J. Insect Physiol.*, 41(9): 745－751.

Wu CJ, Chen J, Fan F, Qin QJ, He YZ, 2011. External morphology, microstructure and light/dark adaptational changes of the compound eyes of *Harmonia axyridis* ab. *conspicua* (Coleoptera: Coccinellidae). *Acta Entomologica Sinica*, 54(11): 1274－1280.［吴春娟，陈洁，范凡，秦秋菊，何运转，2011. 异色瓢虫显现变种复眼的形态、显微结构及其光暗条件下的适应性变化. 昆虫学报，54(11)：1274－1280］

Wu JB, 2008. Biochemical Characters and Purification of Yolk Protein of *Bradysia odoriphaga* and the Hormonal Regulation of Its Vitellogensis. MSc Thesis, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong.［吴举彬，2008. 韭菜迟眼蕈蚊卵黄蛋白的生化特性、纯化及卵黄发生的激素调控. 山东泰安：山东农业大学硕士学位论文］

Zhang JZ, Zhai QH, 1985. On the vitellogenesis of *Coccinella septempunctata*: regulation of vitellogenin synthesis by juvenile hormone analogue. *Acta Entomologica Sinica*, 28(2): 121－128.［张建中，翟启慧，1985. 七星瓢虫的卵黄发生：保幼激素类似物对卵黄原蛋白合成的调节. 昆虫学报，28(2)：121－128］

（责任编辑：袁德成）